

UN CASO DE GRUPO SANGUÍNEO RARO: FENOTIPO p

CARLOS D. DE LA VEGA ELENA^{1, 2}, ÅSA HELLBERG³, SOFIA BONETTI^{1, 2}, CARLOS A. GONZALEZ⁴, SERGIO CHIALINA^{1, 2}, MIGUEL A. RAILLON^{1, 2}, MARIO A. PIVETTA¹, EDITA A. SOLIS^{1, 2}, MARTIN L. OLSSON³

¹Servicio de Hematología y Medicina Transfusional, Hospital Italiano Garibaldi, Rosario, Argentina, ²Instituto Universitario Italiano de Rosario, Rosario, Argentina, ³Blood Centre, University Hospital, Lund, Sweden,

⁴Dirección General Adjunta Redes de Servicios de Salud, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Resumen Un individuo con un fenotipo eritrocitario raro carece de uno o varios antígenos presentes en la mayor parte de la población de pertenencia. Cuando presenta el anticuerpo correspondiente, se pueden producir complicaciones perinatales, transfusionales y/o transplantológicas. Se presenta el caso de una embarazada aloimmunizada derivada a nuestro servicio en la semana 12 de su tercera gesta para su evaluación y seguimiento. El diagnóstico inmunohematológico le asignó el excepcional fenotipo "p" (aproximadamente 1/200 000 individuos), asociado con una mayor tasa de abortos espontáneos y a reacciones transfusionales graves cuando se transfunden unidades incompatibles. El estudio del gen *A4GALT* demostró la presencia de la mutación c.752C > T en doble dosis. Esta mutación lleva a un cambio de una prolina por una leucina en el residuo 251 de la 4- α -galactosiltransferasa. Por parto inducido por sufrimiento fetal, nace a las 36 semanas una bebé con prueba de antiglobulina (Coombs) directa negativa, eluido reactivo, con ictericia que requirió luminoterapia. Una semana después el neonato fue externado sin secuelas aparentes. Posteriormente, a raíz de una cirugía inminente y la improbabilidad de encontrar sangre compatible, se elaboró un plan para cubrir las posibles demandas. Este caso pone en evidencia la necesidad de contar a nivel nacional con un laboratorio de referencia de inmunohematología y un banco de sangre de grupos raros, que permita resolver con celeridad situaciones que requieran transfundir a estos individuos.

Palabras clave: grupo sanguíneo, alelo, glicosiltransferasa, transfusión, aloimmunización, antígeno público, fenotipo p

Abstract *A rare blood group: p phenotype.* A rare blood group is usually defined as the absence of a high prevalence antigen or the absence of several antigens within a single blood group system. These individuals may develop clinically significant red cell antibodies to the high incidence red cell antigens they lack. A 33-year-old alloimmunized woman was referred to our center at the 12th week of her third pregnancy for evaluation and follow up. The laboratory work-up grouped her as belonging to "p" phenotype, associated with difficulties to find compatible blood for transfusion and a high incidence of recurrent miscarriage. At 36 weeks, a baby girl was born by induced labor due to fetal suffering. With a negative direct antiglobulin test but a positive elution test, she was in the neonatology ward for one week receiving luminotherapy. Homozygosity for a missense mutation at position 752 (c.752C > T) in the *A4GALT* gene was found to be responsible for the p phenotype. This mutation changes a proline to a leucine at codon 251 of the 4- α -galactosyltransferase. Recently, due to an imminent surgical intervention and the impossibility to have compatible blood available for transfusion, an autologous donation plan was designed to satisfy probable demand. This case showed the need for blood bank facilities capable to respond satisfactorily to these situations in Argentina. This would facilitate the storage of cryopreserved blood from individuals with rare blood groups for homologous use or to develop rare blood donors programs.

Key words: blood group, allele, glycosyltransferases, transfusion, alloimmunization, public antigen, p phenotype

Presentar un grupo sanguíneo raro o fenotipo eritrocitario raro constituye una situación muy particular. A pesar de no ser considerado un rasgo patológico, el

diagnóstico, seguimiento y pronóstico de un paciente puede verse seriamente comprometido en caso de necesidad transfusional, embarazo o trasplante¹.

Un individuo con un fenotipo eritrocitario raro carece de uno o varios antígenos presentes en la mayor parte de la población de pertenencia. Para ser considerado como raro, éste debe presentarse con una frecuencia poblacional muy baja, que varía dependiendo del país entre 1/250 y 1/10 000 individuos². Esta definición no

Recibido: 10-III-2009

Aceptado: 12-VIII-2009

Dirección postal: Dr. Carlos Daniel De La Vega Elena, Servicio de Hematología y Medicina Transfusional, Hospital Italiano Garibaldi, Virasoro 1249, 2000 Rosario, Santa Fe, Argentina
Fax: (54-341) 4858825 e-mail: daniel.delavega@yahoo.com

contempla a los individuos que presentan antígenos privados o de baja frecuencia, ya que este contexto no genera problemas de disponibilidad de productos sanguíneos compatibles.

En el suero de los individuos con un fenotipo eritrocitario raro puede encontrarse el anticuerpo correspondiente a la especificidad pública faltante, producto de sensibilización por transfusión, embarazo, trasplante o menos frecuentemente, sin una causa atribuible. Estos individuos son generalmente detectados en un estudio pretransfusional de rutina o durante el seguimiento de un embarazo. Desgraciadamente, su descubrimiento puede ocurrir también como consecuencia de un accidente transfusional (hemólisis post-transfusional aguda o retardada) o enfermedad hemolítica feto-neonatal (EHFN).

Uno de los desafíos de la medicina transfusional consiste en la provisión de un adecuado soporte transfusional a aquellos individuos que presentan un fenotipo eritrocitario raro. Esta tarea requiere de una infraestructura que permita, por un lado, la realización de un diagnóstico inmunohematológico certero, y por el otro la gestión de los recursos tendientes a la disponibilidad de las unidades compatibles para el paciente (identificación de los donantes con grupos raros, captación, criopreservación y liberación).

Los actores involucrados suelen ser: el hospital, servicio o laboratorio que detecta el anticuerpo, el laboratorio inmunohematológico de referencia que identifica el anticuerpo y caracteriza el fenotipo raro, y las estructuras a nivel local, nacional e internacional destinadas a la provisión de sangre compatible para estos individuos.

Se han descrito más de 100 fenotipos eritrocitarios raros que se diferencian entre sí por las especificidades antigénicas faltantes, su prevalencia en la población de interés y su importancia clínica. A pesar que cada uno de ellos en particular afecta a relativamente pocos individuos, cuando se considera la totalidad de los fenotipos raros, el número de individuos potencialmente afectado resulta importante³. Los individuos con el fenotipo p son extremadamente poco frecuentes en todas las poblaciones estudiadas (aproximadamente 5.8 individuos / millón de habitantes) y se caracterizan por carecer de los antígenos eritrocitarios P^k, P y P1 y por formar anticuerpos de clase IgM y/o IgG "naturales" y "regulares" contra estos antígenos de alta incidencia faltantes⁴. Esto significa que presentan anticuerpos séricos contra antígenos presentes en prácticamente toda la población y sin mediar un episodio inmunizante como una transfusión o una hemorragia feto-materna.

Los antígenos glucídicos de grupo sanguíneo P^k, P y P1 están estructuralmente relacionados. Al igual que los antígenos del sistema ABO, su expresión se explica bioquímicamente por la presencia del sustrato precursor y de las enzimas (glicosiltransferasas) que catalizan las

correspondientes vías sintéticas. La base molecular de este fenotipo fue descrita recientemente. La ausencia de estos antígenos en las células de individuos con fenotipo p, ocurre por la pérdida de actividad de la 4- α -galactosiltransferasa (α 4Gal-T o P^k sintetasa), una proteína de membrana de tipo II con 353 aminoácidos⁵, encargada de sintetizar al antígeno P^k. El gen *A4GALT* que la codifica, fue clonado en el 2000⁵⁻⁷ y se han identificado hasta el momento 26 mutaciones que anulan la actividad de la enzima^{5,6} y son causales del fenotipo p.

La importancia de identificar a estos individuos se debe esencialmente a la asociación de este fenotipo con una mayor tasa de abortos espontáneos durante el primer y segundo trimestre^{8,9} y a enormes dificultades para obtener sangre compatible a la hora de una transfusión sanguínea.

Estos individuos deben recibir sangre del mismo grupo o, caso contrario, ocurriría una reacción hemolítica transfusional debida a la incompatibilidad inmunohematológica. En los países más desarrollados, el soporte transfusional se basa en el principio de la transfusión homóloga. La autotransfusión clásica con unidades predeposición está limitada en la práctica a cirugías programadas y no es aplicable en caso de pérdidas más importantes que las previstas. Las unidades autólogas congeladas podrían ser útiles; pero no se aconseja su almacenamiento sin un plan transfusional debido a la baja probabilidad de ser reinfundidas.

Aunque existen casos descritos de EHFN por anti-PP1P^k¹⁰, estos no suelen presentar la gravedad de los causados por anticuerpos del sistema Rh. El tratamiento de estas gestantes con fenotipo excepcional e historias de abortos espontáneos implica el uso de plasmaféresis temprana e intensiva con o sin inmunoglobulina intravenosa¹¹⁻¹³, habiéndose notificado que un título del anticuerpo anti-Tj^a menor a 32 preservaría la función normal de la placenta¹³.

Caso clínico

Una paciente de 33 años fue derivada a nuestro servicio en la semana 12 de su tercera gestación (1 parto y 1 aborto a las 14 semanas) para su evaluación y seguimiento. La paciente refirió antecedentes quirúrgicos menores, que no requirieron transfusión de sangre.

Los estudios inmunohematológicos realizados arrojaron los siguientes resultados: Grupo sanguíneo A; RhD negativo. La detección de anticuerpos irregulares resultó positiva, presentando una aglutinina/hemolisina que reaccionó energicamente con todos los glóbulos rojos de los paneles selector, identificador y de 100 donantes de sangre de grupo O Rh negativos ensayados oportunamente, indicando una sensibilización contra un antígeno público. Su título resultó de 32 en medio enzimático. El tratamiento del suero con 2ME redujo la actividad a 4. Este anticuerpo produjo una hemólisis marcada luego de una incubación a 37 °C de todas las unidades de glóbulos rojos enfrentadas. El anticuerpo anti-PP1P^k fue identificado enfrentando el suero a un panel de veinte

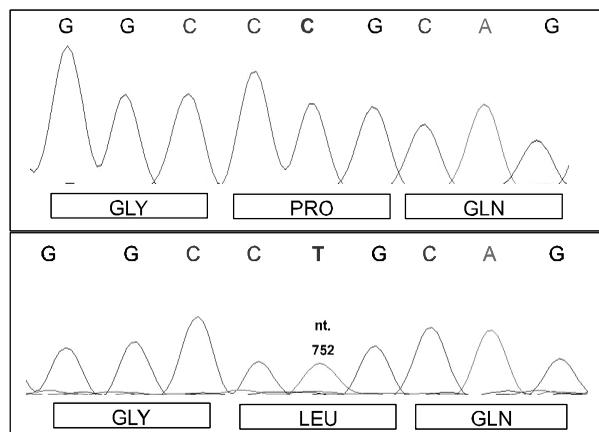


Fig. 1.— Electroferograma de la secuencia del gen *A4GALT* alrededor de la mutación *c.752C > T* encontrada en el caso estudiado (abajo) y la secuencia consenso del alelo salvaje no mutado (arriba). Esta mutación lleva a un cambio de una prolina por una Leucina en el residuo 251 de la 4- α -galactosiltransferasa.

células especialmente seleccionadas por su perfil antigénico. La asignación del fenotipo p fue confirmada a través de la caracterización de los glóbulos rojos con tres antisueros humanos anti-PP1Pk. El estudio familiar permitió identificar a un hermano con el mismo fenotipo excepcional p, de grupo sanguíneo A y RhD positivo.

Durante la tercera gesta se mantuvo el título del anticuerpo constante hasta el momento del parto. Nacido con 36 semanas por parto inducido por sufrimiento fetal y con prueba de Coombs directa negativa, eluido reactivo, el neonato presentó ictericia e hiperbilirrubinemia con predominio indirecto que requirió luminoterapia, y pudo ser externado una semana después.

Posteriormente, se investigó la base genética responsable del fenotipo p en la paciente, realizando la secuenciación completa del gen *A4GALT* como se describió previamente^{6, 14}. Al comparar la secuencia obtenida con la referencia depositada en el *GenBank* (número de acceso AB041418), se encontró una desviación con respecto a la secuencia consenso (Fig. 1) en los nucleótidos 903 (polimorfismo) y *c.752C > T*, identificándose esta última mutación en doble dosis como causal del fenotipo de grupo sanguíneo p en la paciente.

Recientemente, la paciente consultó por una deformación del tabique nasal de etiología traumática asociada a infecciones recurrentes de vías aéreas superiores. Se programó una cirugía electiva para la corrección de la deformidad y, dada la condición clínica y de laboratorio, se elaboró un plan de transfusión autóloga a través de unidades predeposadas. Esta práctica no pudo implementarse por suspensión de la cirugía por causas no médicas.

Discusión

Con respecto al manejo de la tercera gestación, el título del anticuerpo sérico anti-PP1Pk no ameritó un procedimiento invasivo ya que al momento del diagnóstico serológico (fin del segundo trimestre) el riesgo de aborto espontáneo era bajo.

No se detectaron ni sospecharon otras causas posibles para la hiperbilirrubinemia en el neonato, y aunque el bajo título materno de IgG anti-PP1Pk cuestiona su imputabilidad a una hemólisis inmune, se mantuvo la EHFN como diagnóstico de exclusión.

En relación al requerimiento transfusional, este informe pone en evidencia la compleja situación común a aquellos individuos sensibilizados contra un antígeno público. En nuestro país, al no existir un registro de donantes con fenotipo eritrocitarios raros ni bancos de sangre rara congelada, estas situaciones suelen resolverse localmente mediante un programa de autotransfusión y la búsqueda de individuos compatibles entre los familiares del paciente. En ocasiones se solicita la colaboración de bancos de sangre rara extranjeros, que presentan una demora asociada a la gestión y al transporte de las unidades no menor a 72 horas. Ante situaciones de pronto requerimiento transfusional—emergencia hemorrágica— donde no es posible acceder a registros internacionales, se ha ensayado metilprednisolona en altas dosis, con o sin inmunoglobulina intravenosa en altas dosis y/o rituximab pre-trasfusión de unidades incompatibles. Aún no existen ensayos clínicos controlados que avalen esta práctica y los informes son de pocos pacientes.

En este caso, debido a las características de la cirugía electiva y el estado clínico de la paciente, el programa de autotransfusión podría haber resuelto un eventual requerimiento transfusional. El hermano como donante dirigido permaneció como un último recurso para la urgencia, debido al riesgo de aloinmunización para el antígeno RhD y las implicancias obstétricas y transfusionales en el mediano y largo plazo.

La mutación del gen *A4GALT* detectada en la paciente fue descrita anteriormente en individuos con fenotipo p y caracterizada mediante ensayos funcionales⁵, demostrándose una pérdida completa de la función enzimática de la 4- α -galactosiltransferasa.

La identificación de las mutaciones causales de los fenotipos de grupo sanguíneo permite, una vez establecida la concordancia genotipo-fenotipo, predecir un determinado grupo sanguíneo a partir del estudio de material genético. La caracterización de las bases genéticas en el caso del fenotipo p es particularmente importante, ya que presenta un gran número de mutaciones con patrones étnicos y/o geográficos; conocerlas es esencial para el desarrollo de métodos a gran escala (*high throughput screening*, HTS) para determinar a partir de ADN genómico los múltiples genotipos de grupo sanguíneo con importancia transfusional y/o obstétrica. En un futuro, estas tecnologías harán posible estudiar a un gran número de donantes para muchos de estos polimorfismos. Se espera un cambio importante con respecto a la disponibilidad de sangre con grupos raros implementado por tamizado molecular de donantes. Esto permitirá

tratar óptimamente a los pacientes que requieran soporte transfusional prolongado. Por otra parte, nuevos desarrollos podrían evitar o minimizar el uso de sangre en estos casos: Los transportadores artificiales de oxígeno basados en hemoglobina y la transfusión de glóbulos rojos tratados con polietilenglicol (PEG)¹⁵ podrían ser una alternativa terapéutica. Sin embargo aún queda mucho camino por recorrer.

Concluyendo, se necesitan esfuerzos continuados en la identificación de pacientes y donantes con fenotipos raros para asegurarles un adecuado soporte transfusional. Esto requiere la creación a nivel nacional de registros y de un banco de sangre de grupos raros con un laboratorio de referencia *ad hoc* que aporten la logística y permitan resolver con celeridad y autosuficiencia la búsqueda de unidades compatibles.

Conflictos de interés: Los autores declaramos no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Seltsam A, Wagner FF, Salama A, Flegel WA. Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. *Transfusion* 2003; 43: 1563-6.
2. Reesink HW, Engelfriet H, Schennach CP, et al. Donors with a rare pheno (geno) type. *Vox Sanguinis* 2008; 95: 236-53.
3. Peyrard T, Pham BN, Le Pennec PY, Rouger P. The rare blood groups: a public health challenge. *Transfus Clin Biol* 2008; 15: 109-19.
4. De La Vega Elena CD, Hellberg A, Pivetta M, et al. Molecular bases and clinical importance of the exceptional phenotypes of blood group p and Pk. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2008; 24: 2.
5. Iwamura K, Furukawa K, Uchikawa M, et al. The blood group P1 synthase gene is identical to the Gb3/CD77 synthase gene. A clue to the solution of the P1/P2/p puzzle. *J Biol Chem* 2003; 278: 44429-38.
6. Hellberg A, Steffensen R, Yahalom V, et al. Additional molecular bases of the clinically important p blood group phenotype. *Transfusion* 2003; 43: 899-907.
7. Keusch JJ, Manzella SM, Nyame KA, et al. Cloning of Gb3 synthase, the key enzyme in globo-series glycosphingolipid synthesis, predicts a family of alpha 1, 4-glycosyltransferases conserved in plants, insects, and mammals. *J Biol Chem* 2000; 275: 25315-21.
8. Rydberg L, Cedergren B, Breimer ME, et al. Serological and immunochemical characterization of anti-PP1Pk (anti-Tja) antibodies in blood group little p individuals. Blood group A type 4 recognition due to internal binding. *Mol Immunol* 1992; 29: 1273-86.
9. Cantin G, Lyonnais J. Anti-PP1Pk and early abortion. *Transfusion* 1983; 23: 350-1.
10. Levene C, Sela R, Rudolphson Y, et al. Hemolytic disease of the newborn due to anti-PP1 P k (anti-Tj a). *Transfusion* 1977; 17: 568-72.
11. Haentjens-Verbeke K, Dufour P, Vinatier D, et al. Anti-TJa alloimmunization (anti-PP1Pk): two consecutive pregnancies of an anti-TJa-carrying patient. *Fetal Diagn Ther* 1996; 11: 120-5.
12. Fernández-Jiménez MC, Jimenez-Marco MT, Hernández D, et al. Treatment with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in pregnancies complicated with anti-PP1Pk or anti-K immunization: a report of two patients. *Vox Sang* 2001; 80: 117-20.
13. Hanafusa N, Noiri E, Yamashita T, et al. Successful treatment by double filtrate plasmapheresis in a pregnant woman with the rare P blood group and a history of multiple early miscarriages. *Ther Apher Dial* 2006; 10: 498-503.
14. De La Vega Elena CD, Hellberg Å, Pivetta MA, et al. Las bases moleculares del fenotipo p. A propósito de un caso. *Medicina (Buenos Aires)* 2008; 68 (Supl. II): 106-7.
15. Garratty G. Will stealth RBCs replace blood donors of rare types? *Vox Sang* 2002; 83 Suppl 1: 101-4.

Lo importante y lo no importante no son iguales sólo en sus comienzos.

Antonio Porchia (1886-1968)

Voces. 2da. Edición. Buenos Aires: Hachette, 1979, p 118